

Potential of Sea Cucumber Rivet Red Extract (*Holothuria leucospilota*) As Antibacterial MDR (Multi Drug Resistant)

Delianis Pringgenies^{1)*}, Ali Ridlo²⁾, and Henni Pratiwi³⁾

1)Department of Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Diponegoro University, Semarang, Indonesia

2) Department of Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Diponegoro University, Semarang, Indonesia

3) Department of Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Diponegoro University, Semarang, Indonesia

*Corresponding author : Email address (pringgenies@yahoo.com)

ABSTRACT: Resistance of microorganisms to antibiotics is a serious problem in the treatment of infections of this period, it is necessary to search new bioactive compounds that can be used as an antibiotic. Secondary metabolites found in marine organisms is one of the alternative materials discovery of new antibiotics. Such animals as sea cucumbers potential producers of bioactive compounds of secondary metabolism is sea cucumber. Rivet sea cucumbers or *Holothuria leucospilota* is a lot of sea cucumbers found in waters Bandengan, Jepara, but not much utilization. The purpose of the study was to determine the antibacterial activity of the extract fractions rivet red sea cucumber (*H. leucospilota*) against MDR bacteria and compounds that have potential as antibacterial MDR. Analysis of samples of sea cucumbers includes extraction, fractionation, and analysis of bacterial sensitivity test Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS), the extraction process is carried out by solid-liquid extraction method (solid-liquid). Fractionation is done with Open Column Chromatography (KKT). Test sensitivity of bacteria using the agar diffusion method according to the Kirby-Bauer. The results showed that the extract of *Holothuria leucospilota* has 7 fractions active against MDR bacteria *Klebsiella* sp and *Enterobacter* 10. The average value of inhibition zone is highest in fraction III with concentration of 80 ug / disk for each type of bacteria *Klebsiella* sp and *Enterobacter* 10 was 11.87 ± 0.90 mm and 11.49 ± 0.86 mm. The results of GC-MS analysis showed that the fraction IV containing the compound 2-methyl butanoic; 2-butoxy ethanol; 3,5,5 trimethyl 2-cyclohexane-1; propandiat phenyl and 2-methoxy-4-(2-propenyl) or eugenol.

Kata Kunci: *Holothuria leucospilota*, extract, MDR bacteria, antibacterial

PENDAHULUAN

Bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*) merupakan bakteri yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa kelompok antibiotik dan sifat resisten merupakan suatu mekanisme alamiah dari bakteri untuk bertahan hidup sehingga resistensi terhadap obat muncul karena bakteri sudah biasa melawan salah satu antibiotik. Maka harus ada langkah penting dalam pengobatan bakteri resisten yang sebelumnya tidak cocok dengan antibiotik yang ada melalui pengembangan antibiotik baru. Selama ini antibiotik diambil dari organisme darat, padahal banyak organisme laut memiliki potensi farmakologi yang belum dieksplorasi. Organisme laut di perairan Indonesia merupakan sumber metabolisme sekunder yang melimpah karena letak geografinya yang berdampak pada tingkat keragaman perairannya yang tinggi dan unik sehingga banyak senyawa baru yang berpotensi untuk kesehatan. Disisi lain bahwa metabolite sekunder dari perairan Indonesia masih jarang dieksplorasi.

Salah satu organisme laut yang berpotensi sebagai penghasil metabolisme sekunder adalah hewan invertebrata laut. Hewan invertebrata laut memiliki struktur pergerakan fisik lebih terbatas dibandingkan dengan hewan vertebrata laut, sehingga hewan invertebrata laut mengembangkan pertahanan diri mealalui senyawa kimianya untuk pertahanan diri. Metabolisme sekunder pada hewan invertebrata digunakan untuk berkompetisi di lingkungannya, perlindungan diri dari infeksi mikroba dan pemangsaan predator sehingga metabolit sekunder tersebut memiliki prospek sebagai zat aktif dalam bidang farmasi seperti infeksi, antibakteri, neurology, *antiinflammatory*, antivirus, dan antikanker. Salah satu kelas dalam invertebrata laut yang menghasilkan metabolisme sekunder adalah Holothuroidea (teripang). Teripang telah mdianfaatkan teripang sejak zaman nenek moyang bangsa Indonesia untuk kesehatan.

Teripang mempunyai bahan metabolit sekunder yang disebut holothurin. Holothurin memiliki potensi dalam bidang farmasi, yaitu sebagai antijamur (Bhakuni and Rawat, 2006), antikanker (Bhakuni and Rawat, 2006), antibakteri dan antitumor (Mojica *et al.*, 2007). Lipton and Selvin (2004) melaporkan bahwa holothurin juga memiliki potensi *antifouling*. Sehingga perlu dilakukan penelitian senyawa metabolit sekunder dari jenis teripang *Holothuria leucospilota* sebagai

antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak *H. leucospilota* terhadap bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*) dan mengetahui senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri MDR.

METODE

Materi Penelitian

Materi utama dalam penelitian ini adalah sampel *H. leucospilota* yang diperoleh dari perairan Bandengan, Jepara. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Enterobacter* 10, *Enterobacter* 5, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. dan *Coagulase Negative Staphylococcus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Kariadi, Semarang.

Preparasi dan ekstraksi sampel

Sampel *H. leucospilota* biota ini memiliki ciri-ciri berwarna hitam kecoklatan, mengeluarkan getah berwarna putih dari anus dan bersifat lengket. Sampel teripang dikoleksi dari perairan Bandengan, Jepara sejumlah 50 ekor. Sampel teripang langsung dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel, dibelah untuk dikeluarkan organ dalamnya sehingga diperoleh berat basah dari sampel *H. leucospilota* yaitu 2327,35 gram. Sampel *H. leucospilota* kemudian dibawa ke laboratorium untuk dikeringkan dalam oven dengan suhu 45 °C selama 48 jam. Setelah sampel kering maka diperoleh berat keringnya, yaitu 244,39 gram. Selanjutnya dipotong-potong dengan ukuran $\pm 0,5$ cm untuk dilakukan proses ekstraksi.

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi padat-cair bertahap. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam 244,39 gram sampel kering dalam pelarut n-heksan dengan volume 900 ml selama 1 x 24 jam, selanjutnya disaring. Ampas yang telah disaring direndam kembali dengan pelarut n-heksan selama ± 2 jam secara berulang-ulang hingga hasil rendaman jernih. Selanjutnya ampas direndam kembali dengan etil asetat dan metanol secara berurutan dengan cara yang sama seperti pada n-heksan. Filtrat hasil ekstraksi dikumpulkan untuk masing-masing pelarut, kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotavapor* pada suhu ± 40 °C (Mojica *et al.*, 2007).

Berat ekstrak kemudian dihitung dengan menggunakan rumus :

$$W_e = W_{v_2} - W_{v_1}$$

Dimana : W_e = berat ekstrak

W_{v_1} = berat vial kosong

W_{v_2} = berat vial setelah diisi ekstrak

Persen kandungan ekstrak:

$$Ce = \frac{W_2}{W_1} \times 100\%$$

Dimana : C_e = persen berat kandungan ekstrak dalam sampel

W_1 = berat sampel

W_2 = berat ekstrak

Uji kontrol positif dan uji kontrol negatif terhadap bakteri uji

a. Uji kontrol positif

Uji kontrol positif dilakukan dengan menggunakan antibiotik *streptomycin sulfate* dan *amoxicilin* dengan konsentrasi 20 µg/disk. Hal ini bertujuan untuk mengetahui adanya zona hambat yang terbentuk oleh antibiotik yang telah tersedia di pasaran, sehingga dapat digunakan untuk pembandingan kemampuan antibakteri dari ekstrak *H. leucospilota*.

b. Uji kontrol negatif

Uji kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan ketiga pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sampel, yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol terhadap bakteri uji. Hal ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut pada pembentukan zona hambat ekstrak.

Uji aktivitas ekstrak *H. leucospilota* terhadap bakteri uji

Uji aktivitas ekstrak *H. leucospilota* terhadap bakteri uji dilakukan dengan menggunakan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol terhadap bakteri uji. Konsentrasi yang digunakan adalah 80 µg/disk, 40 µg/disk, 20 µg/disk, 10 µg/disk dan 5 µg/disk (Nagarajappa and Goswami, 2007). *Paper disk* diletakkan di atas media agar yang telah diberi bakteri uji, kemudian ekstrak diteteskan di atas paper disk sebanyak 10 µL dengan masing-masing konsentrasi 8 µg/µL, 4 µg/µL, 2

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dan $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pengamatan zona hambat dilakukan setelah 1×24 jam.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT pada ekstrak etil asetat *H. leucospilota* dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄ dan campuran pelarut dengan berbagai perbandingan sebagai fraksi gerak. Plat dipotong-potong dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar 1 cm (Gandjar dan Rohman, 2007). Pada tiap ujung plat dibuat garis 0,5 cm dari ujung masing-masing sebagai titik awal dan titik akhir. Ekstrak dilarutkan hingga 5% terlebih dahulu, kemudian ekstrak ditotolkan pada pertengahan garis awal pada plat dengan pipet kapiler. Plat yang telah ditotolkan ekstrak dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi campuran pelarut dengan berbagai perbandingan. Pelarut yang digunakan untuk membuat campuran pelarut adalah metanol, etil asetat, kloroform dan n-heksan. Gelas beker ditutup rapat hingga eluen mencapai titik akhir, plat diangkat dan dikeringkan. Noda atau spot yang terbentuk dilihat menggunakan sinar UV (Sthal, 1985) dan dicatat nilai Rf.

Harga Rf didefinisikan sebagai berikut (Yazid, 2005):

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dari garis awal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Kromatografi Kolom Terbuka (KKT)

KKT bertujuan untuk memisahkan (fraksinasi) senyawa-senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya (Kristanti dan Aminah, 2008). Ekstrak etil asetat *H. leucospilota* 0,4 gram difraksinasi dengan KKT menggunakan silika gel 60 (0,2-0,5 mm) (Merck) sebanyak 12 gram sebagai fase diam. Pelarut yang digunakan adalah etil asetat dan kloroform dengan perbandingan 3:1.

Kolom yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu, kemudian kapas yang telah dibasahi pelarut dimasukkan ke dalam dasar kolom. Kapas tersebut dibuat sepadat mungkin agar rata dan tidak ada gelembung udara, kemudian diberi kertas saring pada bagian atas kapas. Silika gel sebanyak 12 gram diaktivasi

terlebih dahulu dengan dipanaskan dalam oven pada suhu 120 °C selama \pm 1 jam. Silika gel sebanyak 10 gram dicampur dan diaduk dalam pelarut selama \pm 2 jam, kemudian dimasukkan kedalam kolom secara hati-hati dan sepadat mungkin agar rata sehingga terhindar dari gelembung-gelembung udara. Bagian atas silika gel yang telah rata diberi kertas saring, kemudian silika gel didiamkan selama \pm 24 jam agar memadat. Ekstrak etil asetat *H. leucospilota* sebanyak 0,4 gram dilarutkan dahulu dalam pelarut, kemudian ditambahkan 2 gram silika gel, dicampur hingga homogen dan didiamkan hingga pelarut menguap. Campuran silika gel dan ekstrak kemudian dimasukkan dalam kolom yang telah didiamkan selama \pm 24 jam. Kran kolom dibuka dengan kecepatan alirannya 1 tetes/detik.. Saat kran dibuka, penambahan pelarut dilakukan secara kontinyu ke dalam kolom. Silika gel diusahakan selalu terendam dengan pelarut. Eluat dari kolom ditampung dalam vial dengan volume masing-masing 5 mL dan dianalisis menggunakan KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki pola spot yang sama digabung dalam satu fraksi. Fraksi yang diperoleh dievaporasi dengan *evaporator*.

Uji Aktivitas Fraksi Ekstrak *H. leucospilota* Terhadap Bakteri Uji

Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi agar atau metode cakram menurut prinsip Kirby-Bauer (Lay, 1994). Konsentrasi masing-masing fraksi adalah 80 $\mu\text{g/disk}$, 40 $\mu\text{g/disk}$ dan 20 $\mu\text{g/disk}$. Konsentrasi antibiotik yang digunakan adalah 20 $\mu\text{g/disk}$ (Lampiran 1). Bakteri uji diinokulasi dalam *Nutrient Broth* (NB) (Lampiran 2) kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kepadatan bakteri uji sesuai dengan kekeruhan 0,5 *Mc Farland* (Nakamura *et al.*, 1999). Bakteri uji diratakan pada media agar (Lampiran 2) dengan menggunakan lidi berkapas yang steril, kemudian media agar didiamkan \pm 5 menit (Lay, 1994). *Paper disk* diletakkan di atas media agar yang telah diberi bakteri uji, kemudian fraksi ekstrak etil asetat *H. leucospilota* ditetaskan di atas *paper disk* sebanyak 10 μL dengan masing-masing konsentrasi 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dan 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Lampiran 1). Pengamatan diameter zona hambat dilakukan setiap 24 jam selama 3 x 24 jam. Pengulangan uji aktivitas dilakukan sebanyak 3 kali.

Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)

Analisis GC-MS dilakukan pada fraksi IV dengan dengan volume injeksi 0,1 ml. Kolom yang digunakan adalah Rtx-5Ms dengan panjang 30 meter dan temperatur kolom adalah 80 °C. Diameter kapiler yang digunakan adalah 0,25 mm. Cuplikan ekstrak disuntikkan dalam injektor yang dipanaskan pada temperatur 320 °C yang segera akan menguap dan akan dibawa oleh gas helium sebagai gas pembawa pada kecepatan 27,3 cm/sec. Temperatur awal adalah 80 °C dan temperatur akhir 300 °C dengan kecepatan 10 °C/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi sampel

Ekstraksi terhadap 244,39 gram berat kering *H. leucospilota* dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol. Hasil ekstraksi *H. leucospilota* selengkapnya ditampilkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi *H. leucospilota* dengan Tiga Pelarut yang Berbeda

Pelarut	Berat (gram)	Persentase ekstrak	Bentuk	Warna	Bau
n-Heksan	4,78	1,96	Pasta	Coklat pekat	Amis
Etil asetat	2,24	0,92	Minyak	Coklat muda	Amis
Metanol	34,14	13,97	Pasta	Coklat kehijauan	Amis

Hasil di atas menunjukkan bahwa berat ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi dengan ketiga pelarut adalah berbeda-beda. Ekstrak metanol memiliki berat ekstrak terbesar yaitu 34,14 gram dengan persentase ekstrak 13,97%. Ekstrak etil asetat memiliki berat 2,24 gram dengan persentase ekstrak 0,92% merupakan hasil ekstrak terkecil.

Uji kontrol positif, uji kontrol negatif terhadap bakteri uji

a. Uji kontrol positif

Hasil uji kontrol positif menunjukkan bahwa antibiotik jenis *Streptomicyn sulfate* mampu menghambat aktivitas semua bakteri uji, sedangkan *Amoxicilin* tidak mampu menghambat pertumbuhan semua bakteri uji. *Streptomicyn sulfate*

membentuk diameter zona hambat terbesar terhadap bakteri *Klebsiella* sp., yaitu 8,89 mm dan terkecil terhadap bakteri *Coagulase Negative Staphylococcus* yaitu 7,24 mm. Hasil uji kontrol positif terhadap bakteri uji ditunjukkan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Kontrol Positif Terhadap Bakteri Uji

Bakteri uji	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>Streptomicyn sulfate</i>	<i>Amoxicylin</i>
<i>Enterobacter</i> 10	8,72	0
<i>Enterobacter</i> 5	7,99	0
<i>Escherichia coli</i>	8,40	0
<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>	7,24	0
<i>Pseudomonas</i> sp	8,10	0
<i>Klebsiella</i> sp	8,89	0

UJI KONTROL NEGATIF

Hasil uji kontrol negatif menunjukkan bahwa ketiga pelarut yang digunakan tidak berpengaruh pada aktivitas bakteri uji. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat di sekitar paper disk. Hasil uji kontrol negatif terhadap bakteri uji ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Kontrol Negatif Terhadap Bakteri Uji

Bakteri uji	Diameter zona hambat (mm)		
	n-Heksan	Etil asetat	Metanol
<i>Enterobacter</i> 10	0	0	0
<i>Enterobacter</i> 5	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0
<i>Klebsiella</i> sp.	0	0	0

Uji aktivitas ekstrak *H. leucospilota* terhadap bakteri uji

Uji aktivitas ekstrak *H. leucospilota* terhadap bakteri uji bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri ekstrak *H. leucospilota* dari ketiga pelarut. Ekstrak n-heksan tidak membentuk zona hambat pada semua bakteri uji.

Ekstrak etil asetat dapat membentuk zona hambat pada 4 bakteri uji, yaitu bakteri *Enterobacter* 10, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. dan *Enterobacter* 5. Ekstrak metanol mampu membentuk zona hambat 2 bakteri uji yaitu terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Klebsiella* sp.. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak *H. leucospilota* ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Ekstrak *H. leucospilota*

Bakteri uji	Diameter zona hambat (mm)		
	n-Heksan	Etil asetat	Metanol
<i>Enterobacter</i> 10	0	9,75	0
<i>Enterobacter</i> 5	0	9,65	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	9,32	9,21
<i>Klebsiella</i> sp.	0	9,68	7,01

Bakteri yang paling berpotensi dihambat oleh ekstrak *H. leucospilota* selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas fraksi. Bakteri tersebut adalah *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10. Hal tersebut ditunjukkan dengan besarnya diameter yang terbentuk dan kejernihan zona hambat.

4.1.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan tujuan untuk mencari pelarut yang mampu memisahkan komponen-komponen dalam ekstrak secara optimal. Campuran pelarut dengan perbandingan yang berbeda menghasilkan jumlah noda yang berbeda. Masing-masing noda memiliki nilai Rf yang berbeda. Hasil KLT ditampilkan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Uji Pemisahan Komponen-Komponen Ekstrak *H. leucospilota* oleh Pelarut

No.	Pelarut	Perbandingan	Jumlah noda	Nilai Rf
1	Eti asetat	1 : 0	1	0,92
2	Etil asetat : metanol	1 : 1	1	0,9
3	Etil asetat : metanol	1 : 2	1	0,59
4	Etil asetat : n-Heksan	1 : 1	1	0,81
5	Etil asetat : n-Heksan	2 : 1	1	0,73
6	Etil asetat : kloroform	1 : 1	2	0,57; 0,7
7	Etil asetat : kloroform	2 : 1	2	0,59; 0,73
8	Etil asetat : kloroform	3 : 1	3	0,64; 0,73; 0,84

Berdasarkan hasil di atas diketahui bahwa pelarut yang optimal memisahkan komponen-komponen adalah campuran etil asetat : kloroform dengan perbandingan 3 : 1 yang menunjukkan jumlah noda paling banyak yaitu 3 noda dengan nilai Rf adalah 0,64; 0,73 dan 0,84. Selanjutnya perbandingan pelarut tersebut digunakan sebagai pelarut dalam analisis Kromatografi Kolom Terbuka.

Kromatografi Kolom Terbuka (KKT)

Analisis Kromatografi Kolom Terbuka (KKT) diperoleh 30 vial dengan volume masing-masing vial 5 ml. Masing-masing vial dilakukan analisis dengan KLT dan dikelompokkan dalam 7 fraksi. Hasil selengkapnya ditampilkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengelompokan Eluat KKT

No. vial	Berat (gram)	Jumlah noda	Nilai Rf	Fraksi
1	0,0156	1	0,93	I
2	0,0544	1	0,99	II
3	0,0712	2	0,48; 0,97	III
4-5	0,1204	4	0,23; 0,72; 0,84; 0,9	IV
7-8	0,0249	3	0,68; 0,72; 0,76	V

9-10	0,0164	2	0,68; 0,76	VI
11-30	0,0625	2	0,68; 0,84	VII

Hasil di atas menunjukkan bahwa berat fraksi terbesar adalah fraksi IV, yaitu 0,1204 gram dan fraksi I memiliki berat fraksi terkecil yaitu 0,0156 gram. Masing-masing fraksi menunjukkan jumlah noda yang berbeda-beda. Jumlah noda terbanyak ditunjukkan pada fraksi IV.

Uji aktivitas fraksi Kromatografi Kolom Terbuka terhadap bakteri uji

Fraksi-fraksi yang diperoleh dari Kromatografi Kolom Terbuka diuji kembali aktivitas antibakteri untuk mengetahui fraksi yang paling aktif terhadap bakteri uji *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10. Hasil uji aktivitas fraksi I-VII terhadap bakteri *Klebsiella* sp. secara umum menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi fraksi mempengaruhi besarnya diameter zona hambat. Semakin tinggi konsentrasi, diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar. Hasil uji aktivitas fraksi-fraksi terhadap bakteri *Klebsiella* sp. ditunjukkan pada Tabel 7. Hasil uji fraksi I-VII terhadap bakteri *Enterobacter* sp secara umum menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi fraksi tidak berpengaruh pada besarnya zona hambat. Secara umum fraksi I-VII pada konsentrasi 40 µg/disk mengalami penurunan zona hambat. Hasil uji fraksi-fraksi terhadap bakteri *Enterobacter* 10 ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 7. Hasil Aktivitas Fraksi I-VII Terhadap Bakteri *Klebsiella* sp.

Konsentrasi (µg/disk)	Fraksi	Diameter zona hambat (mm)		
		24 jam	48 jam	72 jam
20	I	8,43 ± 0,36	8,35 ± 0,34	8,72 ± 0,91
	II	8,74 ± 0,83	9,38 ± 0,86	8,88 ± 0,84
	III	9,74 ± 0,45	9,48 ± 0,73	9,51 ± 0,75
	IV	9,71 ± 0,51	9,95 ± 0,98	9,50 ± 0,85
	V	8,60 ± 0,70	8,75 ± 0,62	8,41 ± 0,55
	VI	9,39 ± 0,66	9,54 ± 0,23	9,07 ± 0,10
	VII	8,41 ± 0,66	8,95 ± 0,50	8,49 ± 0,71
40	I	11,68 ± 0,33	11,52 ± 0,38	10,82 ± 0,83

	II	9,56 ± 0,64	9,1 ± 0,65	8,95 ± 0,94
	III	9,73 ± 0,35	9,36 ± 0,85	9,44 ± 0,76
	IV	10,04 ± 0,19	9,87 ± 0,68	9,79 ± 0,32
	V	9,69 ± 0,85	9,47 ± 0,93	9,26 ± 0,76
	VI	9,86 ± 0,06	9,51 ± 0,45	9,38 ± 0,46
	VII	8,57 ± 0,29	8,6 ± 0,66	8,19 ± 0,47
80	I	10,32 ± 0,84	10,34 ± 0,42	9,89 ± 0,45
	II	9,82 ± 0,95	9,32 ± 0,56	9,16 ± 0,55
	III	11,44 ± 0,45	11,63 ± 0,76	11,87 ± 0,90
	IV	10,65 ± 0,79	10,63 ± 0,66	10,25 ± 0,34
	V	10,69 ± 0,51	10,07 ± 0,23	10,09 ± 1,00
	VI	9,66 ± 0,20	9,38 ± 0,24	9,15 ± 0,39
	VII	9,26 ± 0,23	8,93 ± 0,72	8,51 ± 0,79

Keterangan:

- Rata-rata ± SD
- SD = Standart Deviasi

Tabel 8. Hasil Uji Aktivitas Fraksi I-VII Terhadap Bakteri *Enterobacter* I0

Konsentrasi (µg/disk)	Fraksi	Diameter zona hambat (mm)		
		24 jam	48 jam	72 jam
20	I	9,54 ± 0,88	9,29 ± 0,33	8,94 ± 0,74
	II	10,06 ± 0,41	8,84 ± 0,48	9,24 ± 0,59
	III	9,89 ± 0,36	9,79 ± 0,25	9,26 ± 0,08
	IV	10,75 ± 0,82	9,89 ± 0,26	9,85 ± 0,58
	V	9,13 ± 0,31	9,23 ± 0,86	9,13 ± 0,51
	VI	9,91 ± 0,28	10,15 ± 0,49	9,27 ± 0,14
	VII	9,94 ± 0,74	9,55 ± 0,67	9,03 ± 0,65
40	I	9,64 ± 0,49	9,93 ± 0,56	9,95 ± 0,44
	II	8,77 ± 0,84	9,29 ± 0,59	9,15 ± 0,65
	III	9,79 ± 0,06	9,21 ± 0,76	9,19 ± 0,59
	IV	9,72 ± 0,31	9,63 ± 0,76	9,29 ± 0,19
	V	9,61 ± 0,19	10,19 ± 0,68	10,19 ± 0,61
	VI	9,15 ± 0,64	9,29 ± 0,36	8,99 ± 0,55

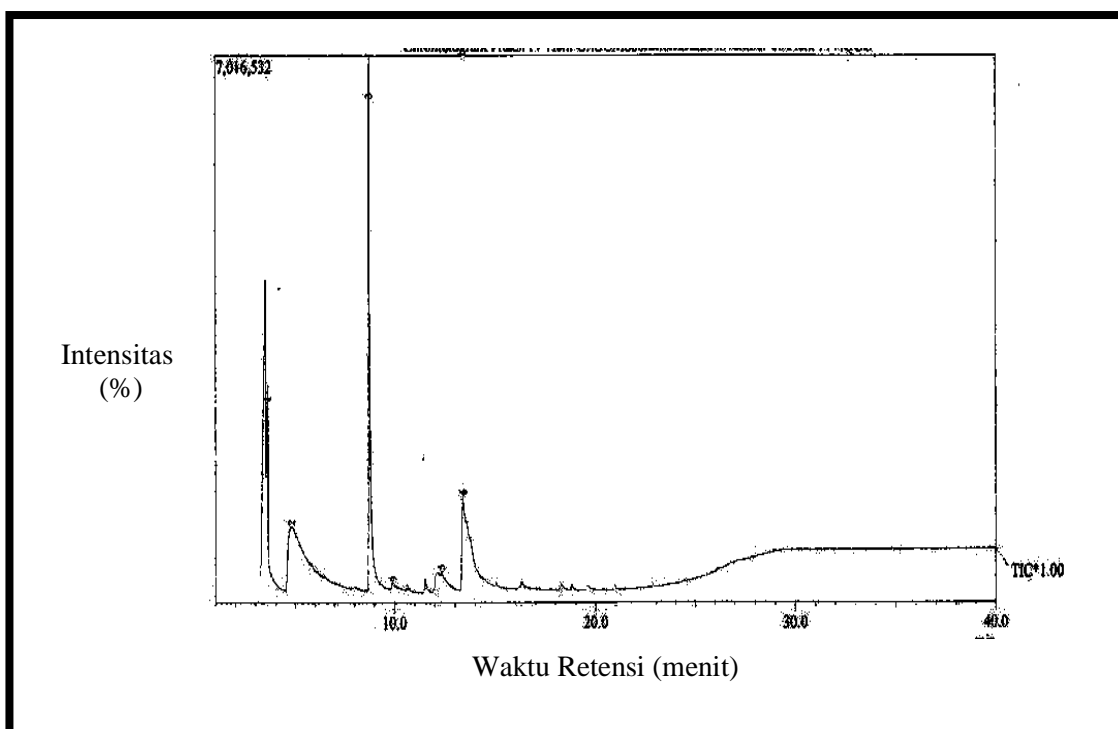
	VII	$8,51 \pm 0,40$	$8,48 \pm 0,27$	$8,47 \pm 0,77$
80	I	$9,43 \pm 0,18$	$8,48 \pm 0,52$	$8,82 \pm 0,38$
	II	$9,83 \pm 0,86$	$9,20 \pm 0,64$	$9,17 \pm 0,96$
	III	$11,49 \pm 0,86$	$10,88 \pm 0,16$	$10,87 \pm 0,89$
	IV	$9,97 \pm 0,81$	$9,36 \pm 0,88$	$9,37 \pm 0,47$
	V	$9,74 \pm 0,48$	$9,12 \pm 0,41$	$9,15 \pm 0,71$
	VI	$10,11 \pm 0,26$	$8,94 \pm 0,47$	$9,25 \pm 0,73$
	VII	$8,36 \pm 0,41$	$7,88 \pm 0,36$	$7,92 \pm 0,41$

Keterangan:

- Rata-rata \pm SD
- SD = Standart Deviasi

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Hasil analisis menggunakan kromatografi gas terhadap fraksi IV menunjukkan bahwa fraksi IV memiliki 6 puncak, artinya fraksi IV terdapat 6 senyawa. Analisis Spektrometri massa berhasil mengidentifikasi 5 senyawa. Hasil analisis GC-MS ditampilkan pada Gambar 1. Hasil identifikasi senyawa dari fraksi IV ditunjukkan pada Tabel 9.



Gambar. 1. Kromatogram Fraksi IV.

Tabel 9. Hasil GC-MS dari Fraksi IV

No puncak	Waktu retensi	Area (%)	SI (Indeks Kemiripan)	Nama senyawa
1	3,620	27.53	95	2-metil butanoat
2	4,825	24.01	98	2-butoksi etanol
3	8,751	22.03	97	3,5,5 trimetil 2-sikloheksen-1
4	9,909	1.93	-	Tidak teridentifikasi
5	12,359	4.82	87	Fenil propanadioat
6	13,404	19.68	91	2-metoksi-4-(2-propenil) (eugenol)

Pembahasan

Uji kontrol positif menunjukkan adanya perbedaan antibiotik *Streptomicyn sulfate* dan *Amoxicilin* dalam menghambat aktivitas bakteri uji. Antibiotik *Streptomicyn sulfate* dapat menghambat aktivitas semua bakteri uji, sedangkan *Amoxicilin* tidak dapat menghambat. Hal tersebut disebabkan karena bakteri uji lebih resisten terhadap antibiotik *Amoxicilin*. Semua bakteri uji telah mengalami resisten terhadap antibiotik *Streptomicyn sulfate* maupun *Amoxicilin*. Berdasarkan *National Committee For Clinical Laboratory Standard* (NCCLS), diameter zona hambat ≤ 11 mm untuk antibiotik *Streptomicyn sulfate* (10 µg/disk) dinyatakan resisten dan *Amoxicilin* (10 µg/disk) dinyatakan resisten dengan zona hambat ≤ 13 mm. Uji kontrol negatif menunjukkan ketiga pelarut yang digunakan tidak membentuk zona hambat terhadap bakteri uji. Sehingga pembentukan zona hambat oleh ekstrak *H. leucospilota* bukan diakibatkan oleh pelarut, melainkan oleh komponen dalam ekstrak *H. leucospilota*. Trianto *et al.* (2004) menyatakan bahwa adanya zona hambatan pada *paper disk* yang terendam ekstrak, membuktikan bahwa senyawa bioaktif dalam ekstrak bekerja efektif dan bukan pengaruh pelarut karena pada kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat.

Dugaan tentang potensi ekstrak *H. leucospilota* sebagai antibakteri dibuktikan dengan adanya aktivitas ekstrak terhadap bakteri uji. Hal tersebut dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat disekitar *paper disk*. Lay (1994) menyatakan bahwa penghambatan pertumbuhan bakteri oleh antibiotik terlihat dari daerah jernih di sekeliling *paper disk*. Ekstrak etil asetat *H. leucospilota* aktif

pada bakteri *Enterobacter* 10, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Enterobacter* 5. Ekstrak metanol *H. leucospilota* aktif pada bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Klebsiella* sp., sedangkan ekstrak n-heksan *H. leucospilota* tidak aktif pada semua bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa non polar dalam ekstrak *H. leucospilota* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap semua bakteri uji. Perbedaan aktivitas antibakteri dari masing-masing ekstrak diduga dipengaruhi oleh kepolaran komponen ekstrak. Menurut Hartini *et al.* (2008) kepolaran senyawa mempengaruhi senyawa menembus dinding sel bakteri. Senyawa bersifat polar mengakibatkan senyawa lebih mudah menembus dinding sel. Purwoko (1998) menyatakan bahwa ekstrak semi polar ke arah non polar lebih berpotensi menimbulkan efek toksin, karena sifatnya yang sukar disekresikan oleh organisme dibandingkan dengan senyawa yang bersifat polar.

Berdasarkan hasil pengujian KLT, pelarut yang menghasilkan pemisahan terbaik komponen dari ekstrak etil asetat *H. leucospilota* adalah campuran pelarut etil asetat : kloroform dengan perbandingan 3 : 1 yang membentuk 3 noda seperti yang ditampilkan dalam Tabel 5. Noda yang terbentuk pada plat silika tidak dapat dilihat secara langsung dengan mata, sehingga digunakan UV untuk menampakkan noda. Kristanti dan Aminah (2008) menyatakan bahwa penggunaan sinar UV merupakan salah satu metode untuk menampakkan noda pada plat silika. Menurut Stahl (1985), deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (radiasi utama kira-kira 256 nm) atau senyawa dapat menyerap UV pada gelombang pendek dan atau gelombang panjang (365 nm). Kemampuan pelarut untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak ditunjukkan dengan banyaknya noda atau spot yang terbentuk dan terpisah. Campuran pelarut tersebut kemudian digunakan dalam Kromatografi Kolom Terbuka (KKT). Senyawa dalam ekstrak etil asetat *H. leucospilota* memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda, yaitu dengan pembentukan noda dengan R_f yang berbeda. Menurut Sastrohamidjodjo (2001), setiap senyawa memiliki R_f yang berbeda sehingga perbedaan antara dua noda pada plat KLT menunjukkan adanya senyawa yang berbeda. Senyawa yang memiliki nilai R_f mendekati nol merupakan

senyawa polar, sedangkan senyawa yang memiliki nilai Rf mendekati satu merupakan senyawa non polar.

Analisis KKT diperoleh 30 vial dengan volume masing-masing 5 mL, selanjutnya dianalisis dengan KLT dan dikelompokkan kedalam 7 fraksi. Pengelompokkan dalam satu fraksi berdasarkan pada pola noda yang terbentuk pada plat. Masing-masing fraksi memiliki nilai Rf yang berbeda. Adanya perbedaan nilai Rf menunjukkan adanya perbedaan komponen senyawa yang terkandung pada masing-masing fraksi. Fraksi IV memiliki berat paling besar (0,1204 gram) sehingga kemungkinan di dalam ekstrak etil asetat *H. leucospilota* mengandung banyak komponen dalam fraksi IV.

Uji aktivitas fraksi I – VII ekstrak etil asetat *H. leucospilota* terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10 . Hal ini disebabkan, kedua bakteri tersebut membentuk zona hambat yang lebih besar dan jernih daripada bakteri uji lainnya (*Enterobacter* 5, *Escherichia coli*, *Coagulase Negative Staphylococcus* dan *Pseudomonas* sp.) pada uji aktivitas ekstrak *H. leucospilota*. Uji aktivitas fraksi I – VII ekstrak etil asetat *H. leucospilota* terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10 menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Hal tersebut ditunjukkan pada pembentukan diameter zona hambat di sekitar *paper disk* (Lay,1994). Fraksi I – VII ekstrak etil asetat *H. leucospilota* membentuk zona hambat yang lebih besar jika dibandingkan dengan antibiotik *Streptomycin sulfate* dan *Amoxicilin* dengan konsentrasi yang sama (20µg/disk). Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas Fraksi I – VII ekstrak etil asetat *H. leucospilota* terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10 lebih baik daripada antibiotik *Streptomycin sulfate* dan *Amoxicilin*.

Hasil uji aktivitas fraksi pada bakteri *Klebsiella* sp. menunjukkan adanya perbedaan diameter zona hambat pada masing-masing fraksi. Ketujuh fraksi dengan konsentrasi yang berbeda (20 µg/disk, 40 µg/disk, 80 µg/disk) menunjukkan hasil yang berbeda selama masa inkubasi. Fraksi III pada konsentrasi 80 µg/disk merupakan fraksi yang memiliki rata-rata diameter zona hambat paling besar, sehingga paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella* sp.

Penambahan besarnya konsentrasi fraksi II, III, IV, V dan VII pada bakteri *Klebsiella* sp. berpengaruh terhadap pembentukan diameter zona hambat. Semakin besar konsentrasi fraksi, diameter zona hambat mengalami peningkatan. Sehingga kemungkinan dengan bertambahnya konsentrasi maka bertambah pula kandungan senyawa aktif dalam fraksi tersebut. Prijono (1994) menyatakan bahwa kandungan bahan bioaktif yang menghambat pertumbuhan bakteri uji bertambah seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Untuk fraksi I dan VI mengalami kenaikan diameter zona hambat pada konsentrasi 40 µg/disk, sehingga konsentrasi 40 µg/disk merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk fraksi I dan VI dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella* sp..

Hasil uji aktivitas ketujuh fraksi dengan konsentrasi yang berbeda (20 µg/disk, 40 µg/disk, 80 µg/disk) pada bakteri *Enterobacter* 10 menunjukkan hasil yang berbeda selama masa inkubasi. Fraksi III pada konsentrasi 80 µg/disk merupakan fraksi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Enterobacter* 10 karena memiliki rata-rata diameter zona hambat paling besar. Penambahan konsentrasi pada ketujuh fraksi tidak mempengaruhi bertambahnya diameter zona hambat. Fraksi IV, VI dan VII menghambat pertumbuhan bakteri lebih optimal pada konsentrasi 20 µg/disk. Konsentrasi yang optimal menghambat pertumbuhan bakteri oleh fraksi I dan V adalah konsentrasi 40 µg/disk. Fraksi II dan III menghambat pertumbuhan bakteri lebih optimal pada konsentrasi 80 µg/disk.

Secara umum ketujuh fraksi tersebut bersifat bakteristatik, karena pada masa inkubasi 48 jam telah mengalami penurunan diameter zona hambat. Menurut Wattimena *et al.* (1991) zat antibakteri dikatakan bersifat bakteristatik bila menunjukkan penyempitan zona hambat dan pengurangan kecerahan setelah inkubasi 24 jam, akan tetapi dikatakan bakteriasidal bila mampu membentuk zona hambat yang tetap bening sampai waktu inkubasi 48 jam.

Ketujuh fraksi hasil KKT memiliki perbedaan dalam kemampuan menghambat bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10, hal tersebut dilihat dari perbedaan besarnya pembentukan zona hambat. Perbedaan besarnya pembentukan zona hambat tersebut disebabkan karena perbedaan senyawa yang terkandung dalam masing-masing fraksi. Menurut Loomis (1978), perbedaan aktivitas toksik

yang ditimbulkan oleh suatu senyawa diakibatkan karena setiap senyawa akan bekerja atau bereaksi secara spesifik pada sasarannya. Perbedaan besarnya zona hambat dari ketujuh fraksi hasil KKT diduga karena perbedaan mekanisme pertahanan diri bakteri. Bakteri memiliki mekanisme pertahanan diri yang berbeda-beda dalam mempertahankan hidupnya dari tekanan-tekanan lingkungan. Tekanan lingkungan hidup tersebut dapat berupa kondisi lingkungan yang berubah dan salah satunya adalah keberadaan senyawa antibiotik. Irianto (2006) menyatakan beberapa faktor yang mempengaruhi penghambatan bakteri *in vitro* adalah pH lingkungan, komponen-komponen medium, stabilitas obat, takaran inkulum, lamanya inkubasi dan aktivitas metabolisme mikroorganisme. Analisis GC-MS menggunakan fraksi IV, karena fraksi tersebut mampu membentuk zona hambat yang lebih baik dari fraksi lainnya hingga masa inkubasi 72 jam. Hasil analisis menggunakan kromatografi gas terhadap fraksi IV menunjukkan bahwa fraksi IV menunjukkan 6 puncak yang terdeteksi, artinya fraksi IV terdapat 6 senyawa. Analisis Spektrometri massa berhasil mengidentifikasi 5 senyawa, yaitu 2-metil butanoat; 2-butoksi etanol; 3,5,5 trimetil sikloheksen-1; fenil propanadioat; 2-metoksi-4-(2-propenil) atau eugenol. Senyawa yang teridentifikasi pada fraksi IV diduga memiliki aktivitas antibakteri adalah 2-metoksi-4-(2-propenil) atau eugenol, sehingga senyawa eugenol diduga yang menyebabkan adanya aktivitas fraksi IV sebagai antibakteri, karena senyawa eugenol memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Nakamura *et al.* (1999) menyatakan bahwa eugenol dalam *Ocimum gratissimum L.* memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Menurut Siswandono dan Sukardjo (1995), eugenol \pm 82 % terkandung dalam minyak cengkeh, digunakan sebagai antiseptik pada obat kumur dan analgesik pada sakit gigi. Adanya gugus metoksi dapat menunjang aktivitas antiseptik dan anestetik. Ditambahkan pula oleh Simasatikul *et al.* (2008), eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$), contohnya 2-metoksi-4-(2-propenil) merupakan kelompok senyawa alilbenzena.

Kesimpulan

1. Ekstrak etil asetat *H. Leucospilota* memiliki 7 (tujuh) fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR yaitu bakteri *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* 10. Nilai rata-rata zona hambat tertinggi untuk fraksi III dengan konsentrasi 80 µg/disk bakteri *Klebsiella* sp dan *Enterobacter* 10 adalah $11,87 \pm 0,90$ mm dan $11,49 \pm 0,86$ mm.
2. Analisis GC-MS fraksi IV berhasil mengidentifikasi 5 senyawa, yaitu 2-metil butanoat; 2-butoksi etanol; 3,5,5 trimetil sikloheksen-1; fenil propanadioat; 2-metoksi-4-(2-propenil) atau eugenol. Senyawa 2-metoksi-4-(2-propenil) atau eugenol berpotensi sebagai antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*).

DAFTAR PUSTAKA

- Bhakuni, D.S. and D.S. Rawat. 2005. Bioactive Marine Natural Products. Springer : 1-381.
- Gandjar, I.G. dan A. Rohman. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 490 hlm.
- Hartini, Y.S., C.J. Soegihardjo, A.I.C. Putri, M.I.A. Setyorini, dan D. Kurniawan. 2008. Daya Antibakteri Campuran Ekstrak Etanol Buah Adas (*Foeniculum vulgare* Mill) dan Kulit Batang Pulasari (*Alyxia reinwardtii* BL). <http://www.usd.as.id> (2 September 2008).
- Kristanti, N dan S. Aminah. 2008. Buku Ajar Fitokimia Laboraturium Kimia Organik Fakultas MIPA. Airlangga ,Surabaya., 165 hlm.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba Di Laboratorium. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta, 168 hlm.
- Mojica, E. R., E. R.J. Layson, M.C.A. Rodil and C.C Deocariss. 2007. Marine Invertebrates As Source of Potential Antitumor and Antibacterial Agents. <http://www.pcamrd.dost.gov.ph/zone2/papers/8th/mojica1.pdf> (25 November 2007).
- Nakamura, C.V., T.U. Nakamura, E. Bando, A.F.N. Melo, D.A.G. Cortez, and B. R.D. Filho. 1999. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Mem inst oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 94 (5): 675-678.
- Nagarajappa and U. Goswami. 2007. Antibacterial Peptide from Coelomic Fluid of a Sea Cucumber. <http://www.nio.org> (7 September 2007).
- Purwoko, A. 1998. Uji Toksisitas Ekstrak Kloroform dan Ekstrak Metanol Beberapa Jamu Pengatur Haid Dengan BST. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Priyono, D. 1994. Teknik Pemanfaatan Insektisida Botanis. IPB, Bogor, 123 hlm.
- Stahl, E. 1985. Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi. Penerbit ITB, Bandung, 267 hlm.
- Sastrohamidjojo, H. 2001. Kromatografi. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Simasatikul, N, P. Boontuangphisan, D. Richpol, K. Gatphayak, P. Padungtod, P. Pirintra, P. Yamsakul, T. Vearasilp, and U.T. Meulen. 2008. Antibacterial Activity of Standard Eugenol Against *Salmonella* spp.. *Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development* (abstrak).
- Trianto, A., E. Wibowo, Suryono dan R. Sapta S 2004. Ekstrak Daun *Aegiceras corniculatum* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Ilmu Kelautan*, 9 (4): 186-189.
- Wattimena, J. R., N. C. Sugiarto, M. B. Widiyanto, E. Y. Sukandar, A. A. Soemardji, dan A. R. Setiadi. 1991. Farmakodinami dan Terapi Antibiotik. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 168 hlm.
- Yazid, E. 2005. Kimia Fisika Untuk Paramedis. Penerbit Andi, Yogyakarta, 230 hlm.